

Rec'd PCT/PTO 10 DEC 2004

PCT/JP 03/07335

10/516315

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

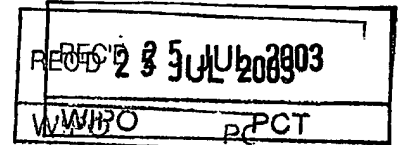
10.06.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年 6月11日

出願番号
Application Number: 特願2002-169743
[ST. 10/C]: [JP2002-169743]



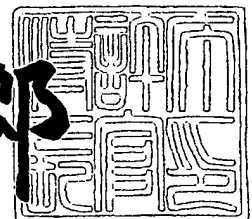
出願人
Applicant(s): 株式会社ジェンコム

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 7月 9日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 A21383A

【提出日】 平成14年 6月11日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

 【住所又は居所】 埼玉県さいたま市辻 4-12-17

 【氏名】 室伏 きみ子

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県神戸市灘区楠ヶ丘町 4-2-8-202

 【氏名】 向井 睦子

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都目黒区平町 2-1-7

 【氏名】 小林 進

【発明者】

 【住所又は居所】 埼玉県さいたま市辻 4-12-17

 【氏名】 室伏 擴

【特許出願人】

 【識別番号】 500038570

 【氏名又は名称】 株式会社ジェンコム

【代理人】

 【識別番号】 110000109

 【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス

 【代表者】 今村 正純

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 170347

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1
【プルーフの要否】 要

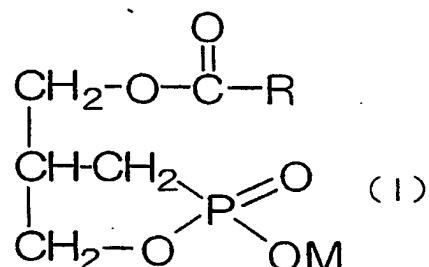
【書類名】 明細書

【発明の名称】 カルバ環状ホスファチジン酸誘導体

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記式 (I) :

【化 1】



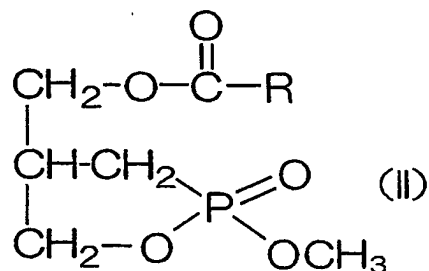
(式中、Rは、炭素数1～30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。Mは、水素原子又は対カチオンである。)

で示される化合物。

【請求項 2】 下記式 (I) において、Rが $-\text{C}_{15}\text{H}_{31}$ 、 $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CHC}_6\text{H}_{13}$ 、又は $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CHC}_8\text{H}_{17}$ であることを特徴とする、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】 下記式 (II) :

【化 2】



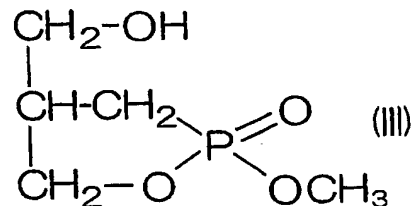
(式中、Rは、炭素数1～30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数2～30の直鎖状若しくは

は分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。)

で示される化合物。

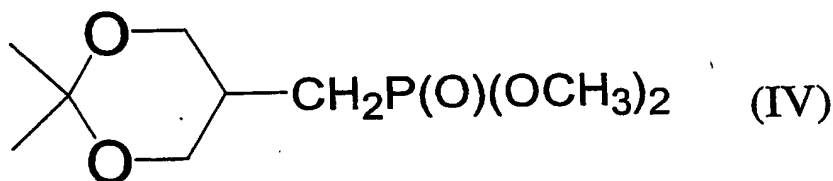
【請求項4】 下記式 (III) で示される化合物。

【化3】



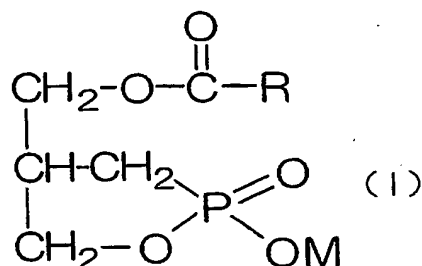
【請求項5】 下記式 (IV) で示される化合物。

【化4】



【請求項6】 下記式 (I) :

【化5】



(式中、Rは、炭素数1～30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。Mは、水素原子又は対カチオンである。)

で示される化合物を有効成分として含む医薬。

【請求項 7】 抗癌剤として使用する、請求項 6 に記載の医薬。

【請求項 8】 癌細胞の浸潤を抑制することにより癌の転移を抑制する、請求項 7 に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、カルバ環状ホスファチジン酸誘導体、及びそれを用いた医薬に関する。

【0002】

【従来の技術】

リゾホスファチジン酸 (LPA, lysophosphatidic acid) は、生体膜を構成するリン脂質の中で最も単純な構造を持っており、ホスファチジン酸 (PA) からグリセロールの sn-1 位あるいは 2 位の脂肪酸のどちらか一方が脱アシル化されたものである (図 1)。通常の細胞において、全リン脂質中にしめる LPA の割合は 0.5% 以下ときわめて少なく、1980 年代までは単に、リン脂質生合成の中間体や分解産物としてしか認識されていなかった。しかし最近、LPA の様々な生理活性が示され (Moolenaar, W.H. : Exp. Cell Res. 253, 230-238 (1999))、さらに、細胞膜上の複数の受容体の存在も明らかになって (Guo, Z., 他, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 14367-14372 (1996); Hecht, J.H., 他, J. Cell Biol. 135, 1071-1083 (1996); An, S., 他, J. Biol. Chem. 273, 7906-7910 (1998); Bandoh, K., 他, J. Biol. Chem. 274, 27776-27785 (1999); 及び Im, D-S., 他, Mol. Pharmacol. 57, 753-759 (2000))、機能リン脂質として注目されるようになった。

【0003】

LPA は、細胞種によって様々な作用を引き起こす事が知られる。細胞の増殖促進 (van Corven, E.J., 他, Cell 59, 45-54 (1989)) や細胞死の抑制 (Umansky, S.R., 他, Cell Death Diff. 4, 608-616 (1997)) に加え、低分子量 G タンパク質の一つである Rho を介したシグナル伝達系の活性化によって、細胞骨格の変化を導き、繊維芽細胞におけるストレスファイバーの形成 (Gohla, A., 他, J. Biol. Chem. 273, 4653-4659 (1998)) や、神経細胞における神経突起の退縮 (Tigyi, G., 他,

J. Biol. Chem. 267, 21360-21367 (1992); Jalink, K., 他, Cell Growth & Differ. 4, 247-255 (1993); Jalink, K., 他, J. Cell Biol. 126, 801-810 (1994); 及び Tigyi, G., 他, J. Neurochem. 66, 537-548 (1996))、癌細胞の浸潤(Imamura, F., 他, Biochem. Biophys. Res. Commun. 193, 497-503 (1993); O'Connor, K. L., 他, J. Cell Biol. 143, 1749-1760 (1998); Stam, J. C., 他, EMBO J. 17, 4066-4074 (1998))などを誘導する。

【0 0 0 4】

一方、1992年には、真性粘菌 *Physarum polycephalum* の単相体ミクソアメーバから、真核細胞のDNA複製酵素であるDNAポリメラーゼ α の活性を抑え、動物培養細胞の増殖を抑制する脂溶性物質が見いだされ、単離・精製された (Murakami-Murafushi, K., 他, J. Biol. Chem. 267, 21512-21517 (1992))。この物質はグリセロール骨格のsn-1位にシクロプロパンを含むヘキサデカン酸が結合し、2位と3位にリン酸が環状エステル結合した物質であることがわかり (図1)、*Physarum*由来のLPA様物質であることから、PHYLPAと命名された。

【0 0 0 5】

PHYLPAがsn-1位に特徴的な脂肪酸を有することから、一般的な脂肪酸に置換した誘導体を化学合成し、その活性を検討した。その結果、程度に強弱こそあったが、いずれも細胞増殖を抑制することが示され、PHYLPAの増殖抑制作用が、2位と3位の環状リン酸基によることが明らかになった。現在では、このような環状リン酸基を持つLPA類似体を総称して、環状ホスファチジン酸 (cPA, cyclic phosphatidic acid) と呼んでいる (図1)。このcPAは最近、ヒト血清中にアルブミンに結合した形で検出され (Kobayashi, T., 他, Life Sciences 65, 2185-2191 (1999))、広く生物界に存在することが明らかになった。また、このとき分離された脂質画分中のcPAは、パルミチン酸を脂肪酸として持つPal-cPAが主要成分であった。血清の他、ラットやブタの脳でもcPAの存在が確認され、Tigyiらはまた、ウサギの角膜損傷モデルにおいて、房水や涙腺液中に、cPAを含む一群のLPA類縁体を検出している (Lilom, K., 他, Am. J. Physiol. 274, C1065-C1074 (1998))。

【0 0 0 6】

cPAは、LPAと同様な、または相反する様々な生理活性を示すことが明らかになっている。LPAが培養細胞の増殖を促進するのに対し、cPAは抑制作用を示す (Murakami-Murofushi, K., 他, Cell Struct. Funct. 18, 363-370 (1993))。この作用は可逆的であり、培地からcPAを除くと、細胞は再び増殖を始める。増殖抑制作用の機構として、ふたつの可能性が示唆されている。

【0007】

マウス繊維芽細胞 (NIH3T3) において、cPAが細胞内cAMP濃度を数分以内に上昇させることが見いだされている。細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇を妨げることによってこの現象は見られなくなり (Murakami-Murofushi, K., 他, Cell Struct. Funct. 18, 363-370 (1993))、cPAは細胞膜上の受容体を介して Ca^{2+} 依存的なアデニル酸シクラーゼを活性化している可能性が考えられる。細胞内cAMP濃度の上昇がMAPキナーゼの活性化を抑制することが示されており (Hordijk, P. L., 他, J. Biol. Chem. 269, 3534-3538 (1994); 及びHowe, L. R., 他, J. Biol. Chem. 268, 20717-20720 (1993))、このことが、増殖阻害につながる可能性が示唆された。一方、cPAはその構造上、容易に細胞内に取り込まれると考えられる。この点に関し、sn-1位を蛍光標識したcPAを合成し、細胞に添加した後にその挙動を観察することで、cPAが迅速に細胞内に移行し、細胞質中、核の周辺部に局在することが判明している。また、cPAがin vitroで、細胞周期を制御するcdc25ホスファターゼの活性を阻害することが見いだされており (小林哲幸・室伏きみ子: 蛋白質 核酸 酵素 44, 1118-1125 (1999))、このことから、cPAが、細胞膜上の受容体を介さずに、細胞質内でcdk2キナーゼ複合体の活性化を直接抑制することで、細胞の増殖を阻害している可能性も考えられる。

【0008】

また、血清を制限した培地で培養した繊維芽細胞では、LPA、cPA共に、細胞内のアクチン分子によるストレスファイバーの形成を誘導する (小林哲幸・室伏きみ子: 蛋白質 核酸 酵素 44, 1118-1125 (1999))。この場合は、cPAもLPAと同様に、細胞膜受容体への結合を介してRhoを活性化することで、その作用を引き起こすと考えられる。

【0009】

さらに、癌細胞の浸潤については、LPAの促進作用に対し、cPAは強い抑制活性を示す (Mukai, M., 他, Int. J. Cancer 81, 918-922 (1999))。

癌の転移は、腫瘍の悪性化を示す最も顕著な現象であり、複雑な過程を経て成立する。中でも浸潤は特徴的なステップであり、生体内で原発巣から遊離した癌細胞は、間質、血管内に浸潤して血流にのって運ばれ、血管外、さらに遠隔臓器へと浸潤し、そこで増殖して転移巣を作る。In vitroでこの現象を解析するために、明渡らは、ラット腹水肝癌細胞 (AH-130) をラット腹腔に移植した際におこる腹膜浸潤をモデル化し、宿主正常細胞層を越えた癌細胞の移動を定量的に評価できる実験系を開発した (Akedo, H., 他, Cancer Res. 46, 2416-2422 (1986))。通常、浸潤の研究には細胞外基質をコーティングした膜を通り抜けた癌細胞を観察する実験系が用いられるが、その方法に対してこの系は、in vivoをよく反映すると考えられている。この実験系に用いられるいくつかの癌細胞には、その浸潤に血清を必要とするものとししないものがある。AH-130細胞の高浸潤性クローン (MM1) は、その浸潤に血清を必要とし、血清中の浸潤促進物質の検索の結果、少なくともそのうちの 하나가LPAであることが明らかになった (Imamura, F., 他, Biochem. Biophys. Res. Commun. 193, 497-503 (1993))。このことから、LPA構造類似体であるcPAの浸潤に対する影響を調べたところ、LPAとは全く逆に、浸潤を抑制することが見いだされた。いくつかの、sn-1位に異なる脂肪酸が結合した誘導体を合成し、その浸潤抑制活性を調べたところ、Pal-cPAが最も強い浸潤抑制を示した。また、同じアッセイ系において、その浸潤に血清やLPAを必要としないヒト繊維肉腫細胞 (HT-1080) の浸潤も、Pal-cPAによって顕著に抑制された (Mukai, M., 他, Int. J. Cancer 81, 918-922 (1999))。

【0010】

MM1細胞においても、Pal-cPAの添加によって細胞内cAMP濃度は数分のうちに上昇し、LPA共存下においてもこの効果は失われなかった (Mukai, M., 他, Int. J. Cancer 81, 918-922 (1999))。そこで細胞内cAMP濃度を上昇させる試薬を添加したところ、LPA誘導性の浸潤は抑制された。さらに、これらの試薬やPal-cPAの添加によって、LPAによるRhoの活性が阻害されることが示された (Mukai, M., 他, FEBS Letters 484, 69-73 (2000))。これらのことから、この癌細胞 (MM1) において

も、cPAは細胞内cAMP濃度を上昇させることによって、cAMP-dependent Protein Kinase A (Aキナーゼ) の活性化を介してRhoの活性を阻害し、浸潤を抑制する可能性が示唆された。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは以前に、グリセロール骨格のsn-3位のOをCH₂に置換した環状ホスファチジン酸誘導体を合成し、当該誘導体が癌細胞の浸潤を抑制できることを実証している（特願2001-150685号）。本発明では、グリセロール骨格のsn-2位のOをCH₂に置換した新規な構造を有するカルバ環状ホスファチジン酸誘導体を合成し、当該誘導体による癌細胞の浸潤抑制作用を検討することにより、新規な医薬を提供することを解決すべき課題とした。

【0012】

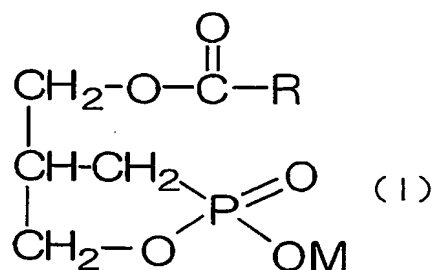
【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記した新規な構造を有するカルバ環状ホスファチジン酸誘導体を合成するために鋭意検討した結果、Dubois らの方法 (Dubois J. et al., Tetrahedron, 47, 1001 (1991)) に従って合成したヨウ化物化合物を原料に用いて Arbuzov 反応を行って (2, 2-ジメチルー [1, 3] ジオキサン-5-イルメチル)-ホスホン酸ジメチルエステルを合成し、次に、この化合物とメタノールおよびp-トルエンスルホン酸水和物とを反応させることにより、(2-メトキシ-2-オキソ-2,1,5-[1, 2] オキサホスホラン-4-イル) メタノールを合成し、さらにこの化合物に所望の脂肪酸を反応させてエステル化することによりグリセロール骨格のsn-2位のOをCH₂に置換した構造を有する環状ホスファチジン酸誘導体を合成することに成功した。上記した合成経路は従来報告のない新規な合成経路である。そして、得られたカルバ環状ホスファチジン酸誘導体を *in vitro* 浸潤アッセイ系において癌細胞の浸潤抑制活性を評価した結果、本発明のカルバ環状ホスファチジン酸誘導体は癌細胞浸潤抑制活性を示すことを実証した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

【0013】

即ち、本発明によれば、下記式 (I) :

【化6】



(式中、Rは、炭素数1～30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。Mは、水素原子又は対カチオンである。)

で示される化合物が提供される。

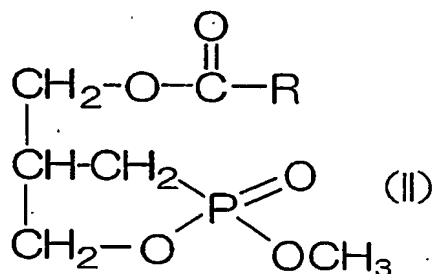
【0014】

好ましくは、下記式(I)において、Rは $-\text{C}_{15}\text{H}_{31}$ 、 $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CHC}_6\text{H}_{13}$ 、又は $-(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CHC}_8\text{H}_{17}$ である。

【0015】

本発明の別の側面によれば、下記式(II)：

【化7】



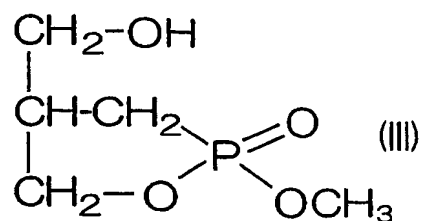
(式中、Rは、炭素数1～30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。)

で示される化合物が提供される。

【0016】

本発明のさらに別の側面によれば、下記式 (III) で示される化合物が提供される。

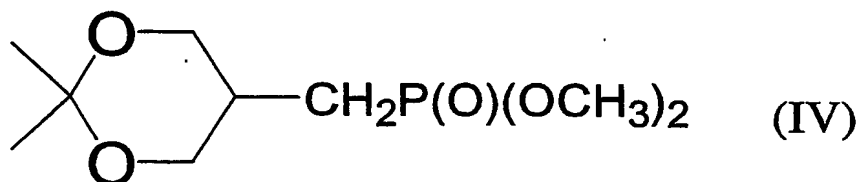
【化8】



【0017】

本発明のさらに別の側面によれば、下記式 (IV) で示される化合物が提供される。

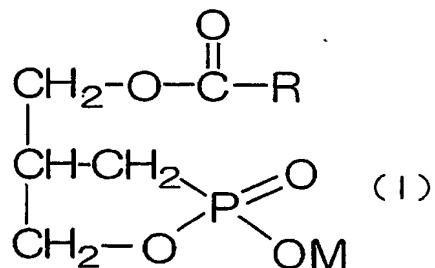
【化9】



【0018】

本発明のさらに別の側面によれば、下記式 (I) :

【化10】



(式中、Rは、炭素数1~30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数2~30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数2~30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含ん

でいてもよい。Mは、水素原子又は対カチオンである。)

で示される化合物を有効成分として含む医薬が提供される。

【0019】

本発明の医薬は、好ましくは、抗癌剤として使用することができ、さらに好ましくは、癌細胞の浸潤を抑制することにより癌の転移を抑制するために使用することができる。

【0020】

本発明のさらに別の側面によれば、治療的有效量の上記式 (I) で示される化合物をヒトを含む哺乳動物に投与することを含む、癌又は癌の転移を抑制する方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記式 (I) で示される化合物の、医薬 (例えば、抗癌剤など) の製造における使用が提供される。

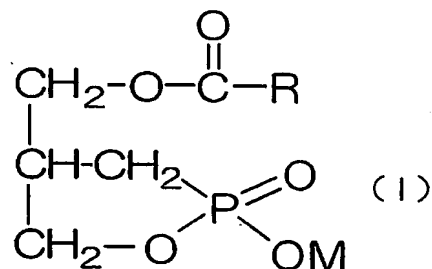
【0021】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

本発明の化合物は、下記式 (I) :

【化11】



(式中、Rは、炭素数1～30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。Mは、水素原子又は対カチオンである。)

で示されるカルバ環状ホスファチジン酸誘導体である。

【0022】

式(I)において、置換基Rが示す炭素数1~30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基の具体例としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、エイコシル基などが挙げられる。

【0023】

置換基Rが示す炭素数2~30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基の具体例としては、例えば、アリル基、ブテニル基、オクテニル基、デセニル基、ドデカジエニル基、ヘキサデカトリエニル基などが挙げられ、より具体的には、8-デセニル基、8-ウンデセニル基、8-ドデセニル基、8-トリデセニル基、8-テトラデセニル基、8-ペンタデセニル基、8-ヘキサデセニル基、8-ヘプタデセニル基、8-オクタデセニル基、8-イコセニル基、8-ドコセニル基、ヘプタデカー8, 11-ジエニル基、ヘプタデカー8, 11, 14-トリエニル基、ノナデカー4, 7, 10, 13-テトラエニル基、ノナデカー4, 7, 10, 13, 16-ペンタエニル基、ヘニコサー3, 6, 9, 12, 15, 18-ヘキサエニル基などが挙げられる。

【0024】

置換基Rが示す炭素数2~30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基の具体例としては、例えば、8-デシニル基、8-ウンデシニル基、8-ドデシニル基、8-トリデシニル基、8-テトラデシニル基、8-ペンタデシニル基、8-ヘキサデシニル基、8-ヘプタデシニル基、8-オクタデシニル基、8-イコシニル基、8-ドコシニル基、ヘプタデカー8, 11-ジイニル基などが挙げられる。

【0025】

上記のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基に含有されうるシクロアルカン環の具体例としては、例えば、シクロプロパン環、シクロブタン環、シクロペンタン環、シクロヘキサン環、シクロオクタン環などが挙げられる。シクロアルカン環は、1個以上のヘテロ原子を含んでいてもよく、そのような例としては、例えば、オキシラン環、オキセタン環、テトラヒドロフラン環、N-メチルプ

ロリジン環などが挙げられる。

【0026】

上記のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基に含有されうる芳香環の具体例としては、例えば、ベンゼン環、ナフタレン環、ピリジン環、フラン環、チオフェン環などが挙げられる。

【0027】

従って、置換基Rがシクロアルカン環によって置換されたアルキル基である場合の具体例としては、例えば、シクロプロピルメチル基、シクロヘキシルエチル基、8, 9-メタノペンタデシル基などが挙げられる。

置換基Rが芳香環によって置換されたアルキル基である場合の具体例としては、ベンジル基、フェネチル基、p-ペンチルフェニルオクチル基などが挙げられる。

【0028】

式(I)で示される環状ホスファチジン酸誘導体中のMは、水素原子又は対カチオンである。Mが対カチオンである場合の例としては、例えば、アルカリ金属原子、アルカリ土類金属原子、置換若しくは無置換アンモニウム基が挙げられる。アルカリ金属原子としては、例えば、リチウム、ナトリウム、カリウムなどが挙げられ、アルカリ土類金属原子としては、例えば、マグネシウム、カルシウムなどが挙げられる。置換アンモニウム基としては、例えば、ブチルアンモニウム基、トリエチルアンモニウム基、テトラメチルアンモニウム基などが挙げられる。

【0029】

本発明はさらに、上記式(II)(式中、Rは、炭素数1~30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数2~30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数2~30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。)で示される化合物、下記式(III)で示される化合物、並びに下記式(IV)で示される化合物に関する。

式(II)、式(III)又は式(IV)で示される化合物は、式(I)で示

される本発明の化合物の合成中間体として有用である。

【0030】

式 (I) の化合物はその置換基の種類に応じて、位置異性体、幾何異性体、互変異性体、又は光学異性体のような異性体が存在する場合があるが、全ての可能な異性体、並びに 2 種類以上の該異性体を任意の比率で含む混合物も本発明の範囲内のものである。

【0031】

また、式 (I) の化合物は、水あるいは各種溶媒との付加物（水和物又は溶媒和物）の形で存在することもあるが、これらの付加物も本発明の範囲内のものである。さらに、式 (I) の化合物及びその塩の任意の結晶形も本発明の範囲内のものである。

【0032】

式 (I) で示される本発明の化合物は、例えば、本明細書の実施例に記載した通り以下の合成経路によって合成することができる。但し、この合成経路は本発明の化合物の合成の一例を示すものにすぎず、他の合成経路によって製造された化合物も本発明の範囲内のものである。

【0033】

(1) 第一工程：

出発化合物としては Dubois らの方法 (Dubois J. et al., Tetrahedron, 47, 1001 (1991).) に従って合成したヨウ化物化合物（以下の実施例に記載のヨウ化物 1）を使用する。ヨウ化物 1 に亜リン酸トリメチルを加え、適当な時間（例えば、数時間から数日程度）加熱還流する。反応の途中で亜リン酸トリメチルを加えて、さらに還流して反応を行なうことができる。反応後の反応液を放冷後、減圧蒸留を行い、残存する亜リン酸トリメチルを除去する。残渣を常法（例えば、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、クロロホルム：メタノール＝15：1で溶出など）で精製することにより（2, 2-ジメチルー [1, 3] ジオキサン-5-イルメチル）-ホスホン酸ジメチルエステル（即ち、式 (IV) の化合物）を得ることができる。

【0034】

(2) 第二工程

上記第一工程で得た(2, 2-ジメチルー[1, 3]ジオキサノー5-イルメチル)-ホスホン酸ジメチルエステルをトルエンに溶解し、メタノールおよびp-トルエンスルホン酸水和物を加え、適当な時間(例えば、30分から10時間程度)加熱還流する。放冷後、溶媒を減圧下留去し、得られた残渣を常法(例えば、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、クロロホルム:メタノール=15:1で溶出など)で精製することにより、(2-メトキシ-2-オキソ-215-[1, 2]オキサホスホラン-4-イル)メタノール(即ち、式(III)の化合物)を得ることができる。

【0035】

(3) 第三工程

上記第二工程で得た(2-メトキシ-2-オキソ-215-[1, 2]オキサホスホラン-4-イル)メタノールをジクロロメタンに溶解し、DMAP、脂肪酸およびWSCを添加し、攪拌して反応させる。ここで用いる脂肪酸としては、例えば、オレイン酸、パルミチン酸、又はパルミトレイン酸など、式(I)の化合物における置換基Rの種類に応じて所望の脂肪酸を使用することができる。反応溶液をメタノールで希釈し、水で洗浄して有機層を酢酸エチルで抽出することができる。有機層を乾燥し、溶媒を除去して得られる粗生成物を常法(例えば、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ベンゼン:酢酸エチル=1:1など)で精製することにより、環状ホスホン酸エステル(即ち、式(II)の化合物)を得ることができる。

【0036】

(4) 第四工程

上記第三工程で得た式(II)で示される環状ホスホン酸エステルをジクロロメタンに溶解し、低温(例えば、-15℃)でTMSBrを加え、適当な時間攪拌する、反応溶液を冷エーテルで抽出し、有機層を乾燥し、溶媒を留去する。得られた粗生成物を、常法(例えば、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ヘキサン:酢酸エチル=2:1、続いてクロロホルム:メタノール=5:1など)で精製することにより式(I)で示される本発明のカルバ環状ホスファチジン酸誘導

体を得ることができる。

【0037】

本発明はさらに、上記定義した式（I）で示される化合物を有効成分として含む医薬に関する。本発明の医薬は、例えば、抗癌剤として使用することができる。

本発明の医薬の用途の一例としては、癌細胞の浸潤を抑制することにより癌の転移を抑制するために使用することができる。

癌の転移は癌細胞の原発巣からの離脱に始まり、細胞外マトリックスの破壊、血管内への侵入、血管内皮細胞層を越えての浸潤、遠隔臓器での接着、増殖という多段階の過程をとる。これらの過程には種々の因子が関与しており、それらの阻害物質が新しい癌転移抑制剤として注目されている。中でも、浸潤は転移という現象の最も特徴的なステップであり、癌細胞の浸潤を抑制する物質の中から優れた制癌剤が開発される可能性は極めて高いと考えられる。本発明の医薬は、癌細胞の浸潤抑制剤として使用できる新規な癌転移抑制剤を提供するものである。

【0038】

本発明における癌転移とは、癌細胞がある場所から他の臓器、器官等に移動・増殖すること、即ち、癌細胞が原発巣から離れた部位に移動して癌が形成されることを意味し、血行性及びリンパ行性の両方を含む。

【0039】

本発明の医薬で処置すべき癌の種類は特には限定されず、良性腫瘍及び悪性腫瘍の全てを包含する。癌の具体例としては、悪性黒色腫、悪性リンパ腫、消化器癌、肺癌、食道癌、胃癌、大腸癌、直腸癌、結腸癌、尿管腫瘍、胆嚢癌、胆管癌、胆道癌、乳癌、肝臓癌、脾臓癌、睾丸腫瘍、上顎癌、舌癌、口唇癌、口腔癌、咽頭癌、喉頭癌、卵巣癌、子宮癌、前立腺癌、甲状腺癌、脳腫瘍、カポジ肉腫、血管腫、白血病、真性多血症、神経芽腫、網膜芽腫、骨髄腫、膀胱腫、肉腫、骨肉腫、筋肉腫、皮膚癌、基底細胞癌、皮膚付属器癌、皮膚転移癌、皮膚黒色腫などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0040】

癌はその種類により、転移しやすい臓器は少しずつ異なり、例えば、乳癌は肺

、肝、骨、リンパ節に、胃癌では肝、肺、骨、副腎に、そして大腸癌では肝、肺、副腎などに高率に転移することが知られている。転移癌の例としては、転移性肝癌、転移性空腸癌、転移性骨腫瘍、転移性脳腫瘍、転移性肺腫瘍、皮膚転移癌、転移性肋骨腫瘍、転移性卵巣癌等がある。好ましい態様によれば、本発明の医薬は、このような癌転移を抑制するために使用することができ、特に、術後の癌転移抑制剤としても有用である。また、本発明の医薬は、臨床的には癌再発抑制剤でもあり、患者の生存期間を延長し、生存率を高めることが期待される。

【0041】

本発明の医薬を抗癌剤として使用する場合、既知の化学療法、外科的治療法、放射線療法、温熱療法や免疫療法などと組み合わせて用いることができる。特に、本発明の医薬は、既知の抗腫瘍剤および／または癌転移抑制物質との併用により、さらに抗癌効果を高めることができる。本発明の抗癌剤を併用することにより、投与すべき既知の抗腫瘍剤および／または癌転移抑制物質の量を減量することができ、これにより、これらの薬物により引き起こされる副作用（白血球減少、血小板減少、出血、貧血、食欲不振、悪心、嘔吐、口内炎、下痢、発疹、脱毛、皮膚の色素沈着、発熱、倦怠感、頭痛、肝機能障害、蛋白尿、浮腫、過敏症等）を低減することができる場合もある。

【0042】

本発明の医薬は、1又は2以上の製剤学的に許容される製剤用添加物と有効成分である一般式（I）で示される化合物とを含む医薬組成物の形態で提供することが好ましい。

【0043】

本発明の医薬は、種々の形態で投与することができ、経口投与でも非経口投与（例えば、静脈内、筋肉内、皮下又は皮内等への注射、直腸内投与、経粘膜投与など）でもよい。経口投与に適する医薬組成物としては、例えば、錠剤、顆粒剤、カプセル剤、散剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤などを挙げることができ、非経口投与に適する医薬組成物としては、例えば、注射剤、点滴剤、坐剤、経皮吸収剤などを挙げることができるが、本発明の医薬の剤形はこれらに限定されることはない。さらに、公知の技術によって持続性製剤とすることもできる。

【0044】

本発明の医薬の製造に用いられる製剤用添加物の種類は特に限定されず、当業者が適宜選択可能である。例えば、賦形剤、崩壊剤又は崩壊補助剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、基剤、溶解剤又は溶解補助剤、分散剤、懸濁剤、乳化剤、緩衝剤、抗酸化剤、防腐剤、等張化剤、pH調節剤、安定化剤などを用いることができ、これらの目的で使用される個々の具体的成分は当業者に周知されている。

【0045】

経口投与用の製剤の調製に用いることができる製剤用添加物として、例えば、ブドウ糖、乳糖、D-マンニトール、デンプン、又は結晶セルロース等の賦形剤；カルボキシメチルセルロース、デンプン、又はカルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤又は崩壊補助剤；ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、又はゼラチン等の結合剤；ステアリン酸マグネシウム又はタルク等の滑沢剤；ヒドロキシプロピルメチルセルロース、白糖、ポリエチレングリコール又は酸化チタン等のコーティング剤；ワセリン、流動パラフィン、ポリエチレングリコール、ゼラチン、カオリン、グリセリン、精製水、又はハードファット等の基剤を用いることができる。

【0046】

注射あるいは点滴用の製剤の調製に用いることができる製剤用添加物としては、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール等の水性あるいは用時溶解型注射剤を構成しうる溶解剤又は溶解補助剤；ブドウ糖、塩化ナトリウム、D-マンニトール、グリセリン等の等張化剤；無機酸、有機酸、無機塩基又は有機塩基等のpH調節剤等の製剤用添加物を用いることができる。

【0047】

本発明の医薬はヒトを含む哺乳動物に投与することができる。

本発明の医薬の投与量は患者の年齢、性別、体重、症状、及び投与経路などの条件に応じて適宜増減されるべきであるが、一般的には、成人一日あたりの有効成分の量として $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $1,000\text{mg}/\text{kg}$ 程度の範囲であり、好ましくは $10\mu\text{g}/\text{kg}$ から $10\text{mg}/\text{kg}$ 程度の範囲である。上記投与量の薬剤

は一日一回に投与してもよいし、数回（例えば、2～4回程度）に分けて投与してもよい。

以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。

【0048】

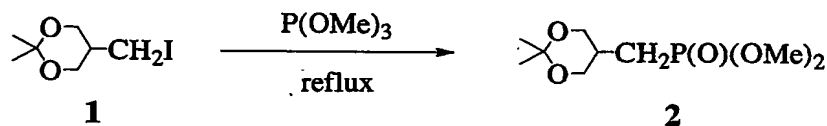
【実施例】

合成例1:

(1) (2, 2-ジメチルー[1, 3]ジオキサン-5-イルメチル)-ホスホン酸ジメチルエステルの合成

【0049】

【化12】



【0050】

Dubois らの方法 (Dubois J. et al., Tetrahedron, 47, 1001 (1991).) に従って合成したヨウ化物1を原料に用い、Arbuzov反応を行った。

ヨウ化物1 (1.12g, 4.62mmol) に亜リン酸トリメチル8.6mLを加え、14時間、130℃で加熱還流をした。亜リン酸トリメチル8.6mLを加え、再び還流を6時間続けた。さらに亜リン酸トリメチル8.6mLを加え、3時間還流を行った。反応液を放冷後、減圧蒸留を行い、残存する亜リン酸トリメチルを除去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール＝15：1）で精製し、ホスホン酸2 (986mg, 90%)を得た。得られた2をそのまま次の反応に用いた。

【0051】

R_f値: 0.33 (Hexane : AcOEt = 1:1)

¹H-NMR (270MHz)

δ: 1.42 (s, 6H, IP)

1.81 (dd, 2H, J = 18.87, 6.93Hz, CH₂P(O)(OMe)₂)

1.92 - 2.21 (m, 1H, H-2)

3.66 (dd, 2H, $J = 12.05, 7.10\text{Hz}$, H-3)

3.78 (d, 6H, $J = 11.22\text{Hz}$, $\text{P}(\text{O})(\text{OCH}_3)_2$)

4.02 (dd, 2Hx1/2, $J = 11.87, 1.32\text{Hz}$, H-3)

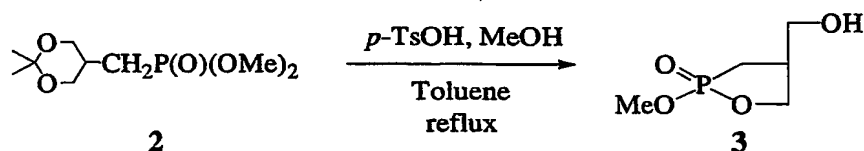
4.17 (dd, 2Hx1/2, $J = 14.68, 7.09\text{Hz}$, H-3)

【0052】

(2) (2-メトキシ-2-オキソ-2,1,5-[1,2]オキサホスホラン-4-イル)メタノールの合成

【0053】

【化13】



【0054】

ホスホン酸2 (76.4mg, 0.32mmol) をトルエン3.8mLに溶かし、メタノール0.13mL および、p-トルエンスルホン酸水和物14.0mg (0.23eq) を加え、2時間45分加熱還流をした。放冷後、溶媒を減圧下留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム：メタノール=15：1) で精製し、環状ホスホン酸3 (40.3mg, 76%) を得た。

【0055】

R_f値: 0.57 (CHCl₃ : MeOH = 4:1)

¹H-NMR (300MHz)

δ : 1.73 - 2.12 (m, 2H, H-4)

2.69-2.87 (m, 1H, H-2)

3.66 (d, 2H, $J = 6.43\text{Hz}$, H-1)

3.78 (dd, 3H, $J = 0.55, 11.02\text{Hz}$, OCH₃)

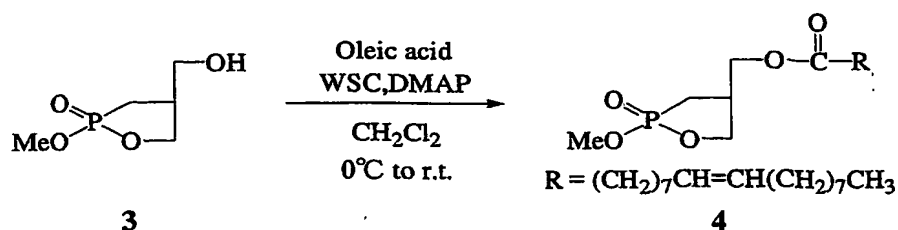
3.83-4.40 (m, 2H, H-3)

【0056】

(3) 9-オクタデセン酸2-メトキシ-2-オキソ-2,1,5-[1,2]オキサホスホラン-4-イルメチルエステルの合成

【0057】

【化14】



【0058】

環状ホスホン酸**3** (8.4mg, 0.051mmol)をジクロロメタン3mLに溶解し、 0°C でDMA P (1.9mg, 0.3eq)、オレイン酸 (18.6mg, 1.3eq)、WSC (19.4mg, 2eq)を加え、室温で1日攪拌した。反応溶液をメタノールで希釈し、水で洗浄して有機層を酢酸エチルで抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ベンゼン：酢酸エチル = 1:1) で精製し、環状ホスホン酸エステル**4** (15.6mg, 72%)を得た。

同様にして、パルミチン酸、パルミトレイン酸を反応させ、パルミチン酸エステル ($\text{R} = (\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$, 89.7mg, 51%)、パルミトレイン酸エステル ($\text{R} = (\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$, 89.6mg, 35%)を得た。

【0059】

4-1 オレイン酸エステル

R_f値: 0.23 (Benzene : AcOEt = 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz)

δ : 0.88 (t, 3H, $J = 6.87$, H-18')

1.26-1.30 (m, 20H, H-4'-7', H-12'-17')

1.60-1.63 (m, 2H, H-3')

1.66-1.77 (m, $2\text{H} \times 1/2$, H-4)

1.99-2.03 (m, 4H, H-8', H-11')

2.04-2.13 (m, $2\text{H} \times 1/2$, H-4)

2.32 (t, 2H, $J = 7.48\text{Hz}$, H-2')

2.82-2.99 (m, 1H, H-2)

3.80 (dd, 3H, $J = 11.14, 4.12\text{Hz}$, OCH_3)

3.76-4.35 (m, 4H, H-1, H-3)

5.31-5.38 (m, 2H, H-9', H-10')

【0060】

4-2 パルミチン酸エステル

Rf値: 0.25 (Hexane : AcOEt = 1:2)

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz)

δ : 0.88 (t, 3H, $J = 6.83\text{Hz}$, H-16')

1.25-1.28 (m, 24H, H-4'-15')

1.59-1.63 (m, 2H, H-3')

1.67-1.78 (m, 2Hx1/2, H-4)

1.98-2.13 (m, 2Hx1/2, H-4)

2.32 (t, 2H, $J = 7.55\text{Hz}$, H-2')

2.83-2.92 (m, 1H, H-2)

3.80 (dd, 3H, $J = 11.23, 3.16\text{Hz}$, OCH_3)

3.94-4.36 (m, 4H, H-1, H-3)

【0061】

4-3 パルミトレイン酸エステル

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz)

δ : 0.88 (t, 3H, $J = 6.83\text{Hz}$, H-16')

1.28-1.30 (m, 16H, H-4'-7', H-12'-15')

1.60-1.61 (m, 2H, H-3')

1.65-1.78 (m, 2Hx1/2, H-4)

2.01-2.02 (m, 4H, H-8', H-11')

2.05-2.13 (m, 2Hx1/2, H-4)

2.32 (t, 2H, $J = 7.43\text{Hz}$, H-2')

2.84-2.96 (m, 1H, H-2)

3.80 (dd, 3H, $J = 11.09, 3.30\text{Hz}$, OCH_3)

3.72-4.36 (m, 4H, H-1, H-3)

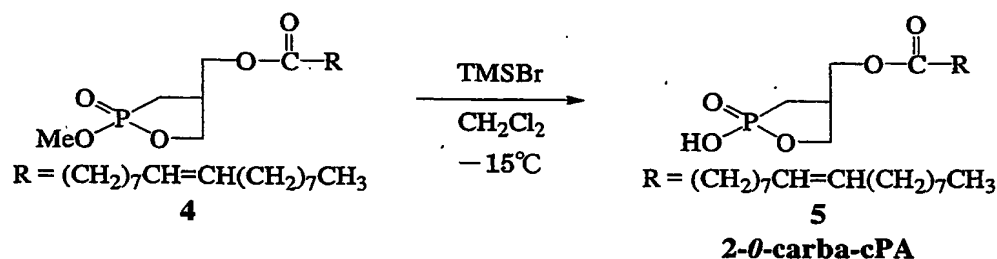
5.30-5.39 (m, 2H, H-9', H-10')

【0062】

(4) 9-オクタデセン酸2-ヒドロキシ-2-オキソ-2λ⁵-[1,2]オキサホスホラン-4-イルメチルエステルの合成

【0063】

【化15】



【0064】

環状ホスホン酸エステル4 (33.3mg, 0.077mmol)をジクロロメタン4mLに溶解し、-15℃でTMSBr (35.5mg, 3eq)を加え、4時間半攪拌した。反応溶液を氷水にあげ、冷エーテルで1回抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下留去した。得られた粗生成物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン：酢酸エチル=2：1→クロロホルム：メタノール=5：1)で精製し、2-0-carba-cPA 5 (12.1mg, 38%)を得た。

同様にして、パルミチン酸エステル(R=(CH₂)₁₄CH₃)、パルミトレイン酸エステル(R=(CH₂)₇CH=CH(CH₂)₅CH₃)を反応させ、2-0-carba-cPA 5の、パルミチン酸エステル(3.5mg, 10%)、パルミトレイン酸エステル(3.4mg, 8%)を得た。

【0065】

5-1 2-0-carba-cPA オレイン酸エステル

R_f値: 0.26 (CHCl₃ : MeOH : H₂O = 60:20:3)

¹H-NMR (500MHz) δ: 0.88 (t, 3H, J = 6.88Hz, H-18')

1.26-1.30 (m, 20H, H-4'-7', H-12'-17')

1.60-1.61 (m, 2H, H-3')

1.70-1.77 (m, 2Hx1/2, H-4)

1.99-2.03 (m, 4H, H-8', H-11')

2.04-2.09 (m, 2Hx1/2, H-4)

2.31 (t, 2H, $J = 7.48\text{Hz}$, H-2')

2.90-2.91 (m, 1H, H-2)

3.92-4.29 (m, 4H, H-1, H-3)

5.31-5.38 (m, 2H, H-9', H-10')

【0066】

5-2 2-O-carba-cPA パルミチン酸エステル

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz) δ : 0.88 (t, 3H, $J = 6.71\text{Hz}$, H-16')

1.26 (m, 24H, H-4'-15')

1.59-1.63 (m, 2H, H-3')

1.70-1.80 (m, $2\text{H} \times 1/2$, H-4)

2.04-2.13 (m, $2\text{H} \times 1/2$, H-4)

2.31 (t, 2H, $J = 7.63\text{Hz}$, H-2')

2.86-2.96 (m, 1H, H-2)

3.91-4.32 (m, 4H, H-1, H-3)

【0067】

5-3 2-O-carba-cPA パルミトレイン酸エステル

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz) δ : 0.88 (t, 3H, $J = 6.85\text{Hz}$, H-16')

1.26-1.30 (m, 16H, H-4'-7', H-12'-15')

1.61 (m, 2H, H-3')

1.70-1.78 (m, $2\text{H} \times 1/2$, H-4)

1.99-2.03 (m, 4H, H-8', H-11')

2.05-2.12 (m, $2\text{H} \times 1/2$, H-4)

2.31 (t, 2H, $J = 7.65\text{Hz}$, H-2')

2.85-2.95 (m, 1H, H-2)

3.91-4.31 (m, 4H, H-1, H-3)

5.31-5.38 (m, 2H, H-9', H-10')

【0068】

試験例 1 :

(材料及び方法)

細胞培養

300gのオスのドンリ्यूラット（日本生物材料）を無菌的に開腹し、それから得た腸間膜を、37℃で15分間、0.25%トリプシン処理し、150 μ mのステンレスメッシュで濾過、遠心して中皮細胞を回収した。2倍量のイーグルMEMアミノ酸ビタミン培地（ニッスイ）を添加したイーグルMEM1（ニッスイ）に、10%FBSを加えたメディウムで、37℃、5%CO₂の条件下で培養した。一週間培養してコンフルエントまで育った単層の中皮細胞を、浸潤アッセイに用いた。

ラット腹水肝がん細胞（AH-130）の高浸潤性クローンであるMM1細胞は、向井らによって確立され（Int.J.Cancer: 81, 918-922(1999)）、中皮細胞と同様の条件下で培養した。

【0069】

In vitro浸潤アッセイ

In vitro浸潤アッセイは、明渡らにより開発された(Cancer Res. 46, 2416-2422(1986))。コンフルエントになるまで育てた中皮細胞層に、25 μ M LPA (SIGMA) 存在下で、MM1細胞を重層培養し、図1に示した各種のcPAを添加した。37℃、5%CO₂の条件下で20時間培養したのち、10%ホルマリンで固定して、位相差顕微鏡下で、浸潤したMM1細胞のコロニーをカウントした。図1において、2-C-ole-cPAは2-O-carba-cPA オレイン酸エステルを示し、2-C-pal-cPAは2-O-carba-cPA パルミチン酸エステルを示し、2-C- Δ pal-cPAは2-O-carba-cPA パルミトレイン酸エステルを示し、3-C-ole-cPA（比較例）は3-O-carba-cPA オレイン酸エステルを示す。

cPA及びLPAは、0.1% fatty-acid free BSA (SIGMA) を含むPBS中で氷冷して超音波処理し、エマルジョン化して、-20℃に保存したものを使用した。

【0070】

（結果）

結果を図1に示す。LPAによって誘導される浸潤 (transcellular migration) に対する、cPA合成誘導体の影響を検討したところ、図1に示したように、グリセロール骨格のsn-2位のOをCH₂に置換した2-C-cPAは、sn-3位のOをCH₂に置換した3-C-cPAと同程度に強く浸潤を抑制した。また、天然体cPAでは、sn-1位にパ

ルミチン酸の結合したものが最も強く浸潤を抑制したが、2-C-cPAでは3-C-cPAと同様に、パルミチン酸よりも、二重結合を1カ所含むオレイン酸、パルミトオレイン酸を結合するものの方が、より強く浸潤を抑制した。

【0071】

【発明の効果】

本発明によりグリセロール骨格のsn-2位のOをCH₂に置換した新規な構造を有する新規な構造を有するカルバ環状ホスファチジン酸誘導体が提供される。本発明のカルバ環状ホスファチジン酸誘導体は癌細胞の浸潤抑制作用を有することから、抗癌剤などの医薬として有用である。

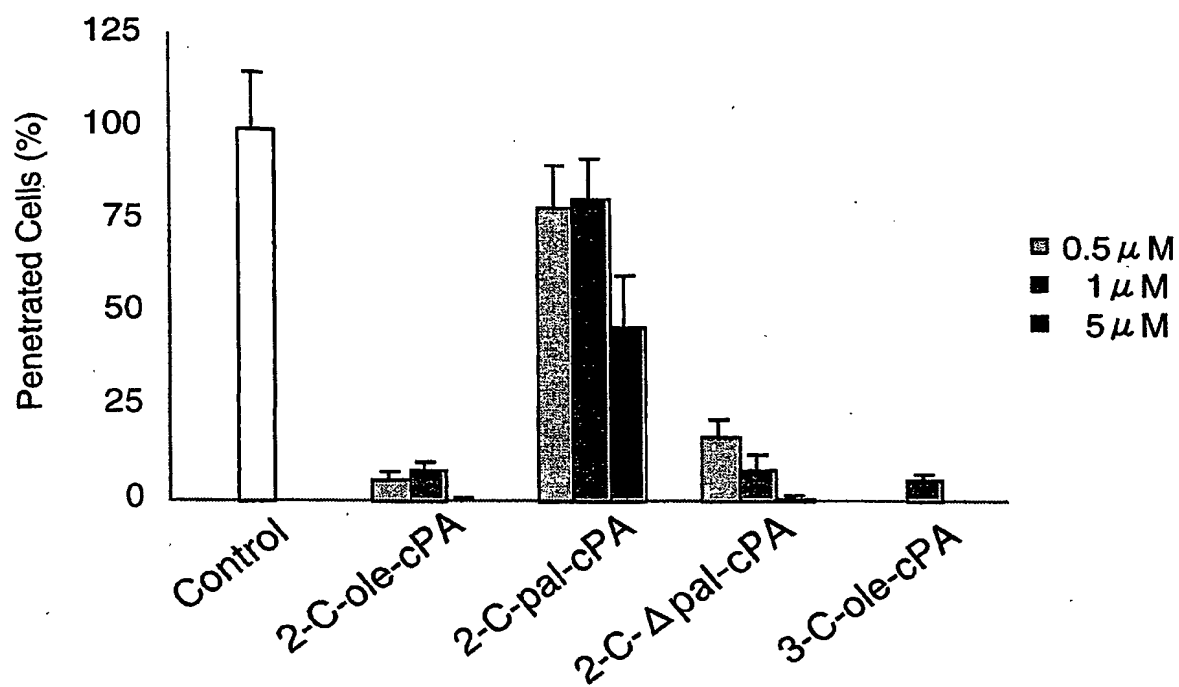
【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、LPAによって誘導される浸潤に対するcPA合成誘導体の影響をIn vitro 浸潤アッセイで調べた結果を示す。

【書類名】 図面

【図1】



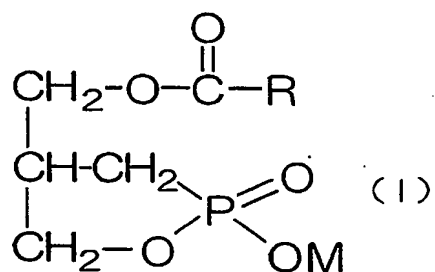
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 グリセロール骨格のsn-2位のOをCH₂に置換した新規な構造を有するカルバ環状ホスファチジン酸誘導体を合成し、当該誘導体による癌細胞の浸潤抑制作用を検討すること。

【解決手段】 下記式 (I) :

【化1】



(式中、Rは、炭素数1～30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルギニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。Mは、水素原子又は対カチオンである。)

で示される化合物。

【選択図】 なし

特願 2002-169743

出願人履歴情報

識別番号

[500038570]

1. 変更年月日

2000年 1月27日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都町田市南大谷11号

氏 名

株式会社ジェンコム